

氏 名 保 科 憲 二

学 位 の 種 類	学術博士
学 位 記 番 号	学博乙第7号
学位授与の日付	平成元年9月30日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第5条第2項）
学位授与の題目	防御因子増強型抗潰瘍剤 Rotraxate hydrochloride の薬理学的研究
論文審査委員	(主査) 五味 保 男
	(副査) 二階堂 修
	(副査) 渡 辺 和 夫

学位論文要旨

Summary

The anti-ulcer effect of 3-[*p*-(trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl)phenyl]-propionic acid hydrochloride (rotraxate) and its mechanisms of action were studied.

Rotraxate (50–400 mg/kg p.o.) showed the anti-ulcer effect in various different types of acute experimental ulcer models. And it prevented the gastric mucosal lesions induced by necrotizing agent. Rotraxate (200 mg/kg/day p.o. for 10 days) accelerated the healing of ulcers in chronic ulcer model. However, rotraxate did not have any effect on the gastric acid secretion. In microautoradiographic examination, rotraxate distributed in the gastric mucosal tissue after oral administration, but not after intraduodenal or intravenous administration. When given orally, content of rotraxate in rat stomach tissue was about 100 times higher than that in plasma. Indomethacin-induced gastric ulcers were inhibited by oral administration of rotraxate, but not by intraduodenal administration. Rotraxate (400 mg/kg i.g.) increased the gastric mucosal blood flow in anesthetized and pylorus-ligated rat, and rotraxate (200 mg/kg p.o.) prevented the decrease of gastric mucosal blood flow induced by indomethacin and of gastric mucosal blood volume induced by serotonin. Rotraxate (20 mg/ml i.g.) inhibited the disruption of the mucosal barrier (i.e. acid-back diffusion and decrease of mucosal potential difference) induced by aspirin (5 mg/ml i.g.). Rotraxate (10, 20 mg/ml/min i.g.) increased the gastric mucosal bicarbonate ion

secretion in rats. Rotraxate (0.1–3 mM) prevented the isolated gastric cell damages induced by acid, aspirin or ethanol in rat. These effects were not influenced by the pretreatment with indomethacin.

In conclusion, these results suggest that, when given orally, rotraxate distributes the gastric mucosa directly from the lumen for eliciting its anti-ulcer effect, and that rotraxate is classified into a type of anti-ulcer drug which promotes the gastric mucosal defensive mechanisms, i.e., increasing the mucosal blood flow and strengthening the mucosal barrier by stimulating mucosal bicarbonate ion secretion and protecting mucosal cells against acid.

新規抗潰瘍剤の3-[*p*-(trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid hydrochloride (rotraxate) の抗潰瘍作用およびその作用機序を薬理学的に検討した。

1. 抗潰瘍作用

Rotraxate の抗潰瘍作用を各種実験潰瘍モデルおよび胃粘膜障害モデルを用いて検討した。Rotraxate (50–400 mg / kg p.o.) は水浸拘束ストレス, aspirin (100 mg / kg p.o.), indomethacin (20 mg / kg p.o.), serotonin (10 mg / kg s.c.) によって惹起された潰瘍, および壊死性物質 (75% ethanol, 0.6 N HCl, and 0.1 N HCl + 60% ethanol) によって惹起された胃粘膜障害を用量依存的に抑制した。この壊死性物質による胃粘膜障害の rotraxate による抑制は prostaglandin 生合成阻害剤の indomethacin (10 mg / kg i.p.) により阻害されなかった。幽門結紮ラットの胃液分泌は rotraxate 400 mg / kg の十二指腸内または胃内投与によって抑制されず, また rotraxate (100 mg / kg i.p.) は bethanechol 刺激による酸分泌亢進を抑制しなかった。0.13 N HCl の胃内灌流と併行して水浸拘束ストレス負荷することによって惹起される胃粘膜出血は rotraxate (25, 50 mg / kg i.p.) によって用量依存的に抑制された。慢性潰瘍モデルである酢酸潰瘍を用いた検討では, rotraxate 200 mg / kg / day の10日間の経口投与により潰瘍の治癒を有意に促進した。これらの結果から, rotraxate は胃粘膜の防御機構に作用する, いわゆる防御因子増強型の抗潰瘍剤であることが示唆された。

2. 胃組織への分布

ラットの胃粘膜組織への rotraxate の分布を検討した。胃粘膜組織の microautoradiography による検討では, [^{14}C]-rotraxate (200 mg / kg) の経口投与により胃粘膜組織への rotraxate の分布が認められたが, 十二指腸内投与および静脈内投与ではこの分布は僅かであった。酢酸潰瘍ラットを用いた分布量の測定では, [^{14}C]-rotraxate (200 mg / kg p.o.) 投与により正常及び潰瘍部位の胃粘膜組織への分布は約 300–400 μg / g tissue であり, 血漿中濃度 (2.12–3.3 μg / ml) にくらべ高い値であった。これらの結果から, rotraxate は経口投与により, 消化管から吸収され血液を介して胃粘膜組織に分布するのではなく, 胃腔内から胃組織に直接移行, 分布することが示唆された。

3. 作用機序

1) 胃腔内から胃粘膜への直接作用

Indomethacin によって惹起される潰瘍は rotraxate (400 mg / kg) の経口投与により著明に抑制されたが、十二指腸内投与では殆ど抑制されなかった。幽門結紮した状態で 0.1 N HCl + 60% ethanol による胃粘膜障害は rotraxate (400 mg / kg) の胃内投与により抑制された。0.1 N HCl + 60% ethanol による胃粘膜障害は rotraxate の経口投与によって抑制されたが腹腔内投与あるいは静脈内投与では抑制されなかった。以上の結果から、経口投与した rotraxate は胃腔内から胃粘膜に直接移行、分布し抗潰瘍作用を発揮する薬剤であることが示唆された。

2) 胃粘膜血流増加作用

Urethane 麻酔下ラットの胃粘膜組織血流を水素ガスクリアランス法により検討した。Rotraxate 400 mg / kg の胃内投与により胃粘膜血流増加が認められた (Figure 1)。また indomethacin (20 mg / kg s.c.) によって惹起される胃粘膜血流低下は rotraxate (200 mg / kg p.o.) により抑制された。ラットの胃粘膜血液量を ^{51}Cr -赤血球法を用いて無麻酔下で検討し、serotonin (20 mg / kg s.c.) による胃粘膜組織血液量の低下は rotraxate (200 mg / kg p.o.) によって抑制された。Rotraxate (1-5 mg i.a.) はイヌの大腿動脈血流を用量依存的に増加させたが、この作用は各種の血管拡張薬の拮抗薬により阻害されなかった。また、prostaglandin 生合成阻害剤の indomethacin (10 mg / kg i.p.) によっても阻害されなかった。ウサギの摘出腹腔動脈平滑筋の nor-epinephrine, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ および K^+ -脱分極下の Ca^{2+} によって惹起される収縮を rotraxate は 0.1-3 mM で濃度依存的に抑制した。以上の結果から、rotraxate の抗潰瘍作用の機序として胃粘膜血流増加作用が示唆された。この血流増加作用は血管平滑筋への直接作用と思われる。

3) 胃粘膜バリアー増強作用

Aspirin (5 mg / ml 胃内投与) によって惹起される麻酔下ラット胃粘膜の酸の逆拡散および胃粘膜電位差の低下は rotraxate (20 mg / ml) の胃内投与により抑制された。Rotraxate (400 mg / kg p.o.) は aspirin (100 mg / kg p.o.) 処置によって惹起される 1 時間後の胃粘膜高分子糖蛋白質含量低下を抑制しなかったが、3-5 時間後の低下を有意に抑制した。

Alcian blue 色素結合法によるラット胃粘膜粘液分泌に及ぼす作用の検討では、rotraxate は粘液分泌に対しては作用を認めなかった。麻酔下ラットの胃内を rotraxate 10, 20 mg / ml で灌流すると用量依存的に胃粘膜の重炭酸イオン分泌が促進された (Figure 2)。この重炭酸イオン分泌促進作用は indomethacin 5 mg / kg i.p. の前処置で影響されなかった。

ラットの単離胃粘膜細胞を用いて塩酸 (pH 4.0), aspirin (1.5 mM) 及び 10% ethanol によって惹起される細胞障害を色素排除法により測定し、この細胞障害に対する rotraxate の抑制作用を検討した。塩酸及び aspirin による細胞障害は rotraxate (1 mM) によって有意に抑制された (Figure 3)。酸性 (pH 5.0) medium 中での ethanol によって惹起される細胞障害は rotraxate により有意に抑制されたが、中性 (pH 7.4) medium

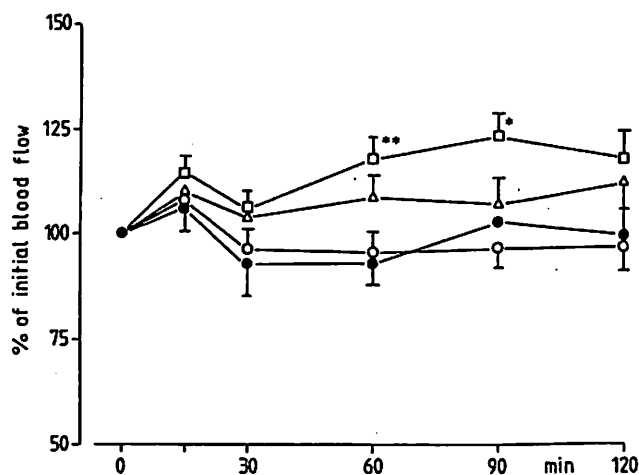


Figure 1

Effect of rotraxate on gastric mucosal blood flow (GMBF) in pylorus-ligated rats. Rostraxate was administered intragastrically. Initial blood flow (ml/min/100g) of control (●), 200 mg/kg (○), 400 mg/kg (□), and 800 mg/kg (△) were 66.5 ± 8.3 (N=10), 55.0 ± 6.0 (N=10), 47.1 ± 7.1 (N=10), and 77.1 ± 6.3 (N=11), respectively. * $p < 0.05$ and * * $p < 0.01$, significant difference from the control.

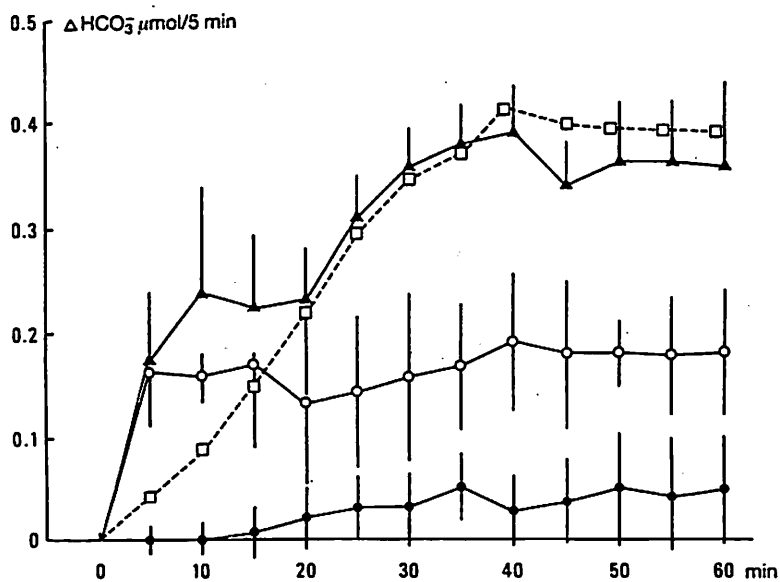


Figure 2

Effect of rotraxate and prostaglandin E_2 on the gastric mucosal HCO_3^- secretion in anesthetized rats. Drugs were perfused at 1 ml/min intragastrically. Each point shows the change in HCO_3^- from the initial level. ●, control (N=5); ○, rotraxate 10 mg/ml/min (N=4); ▲, rotraxate 20 mg/ml/min (N=6); □, prostaglandin E_2 20 μ g/ml/min (N=3)

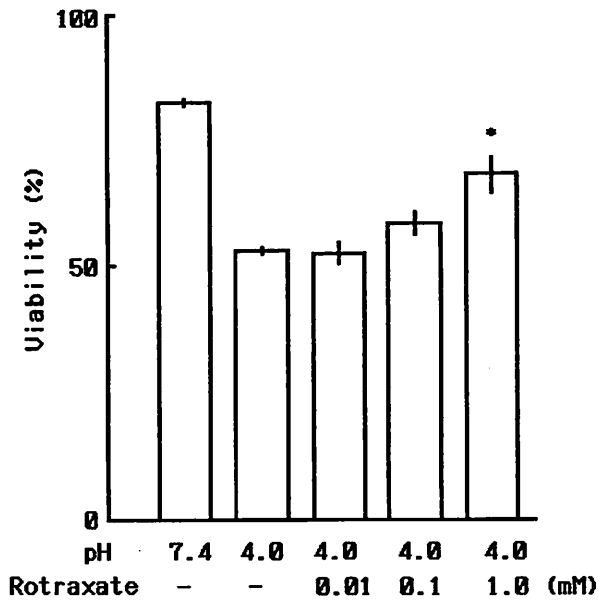


Figure 3

Effect of rotraxate on HCl-induced cell damage. After the treatment with rotraxate for 30 min, mucosal cells were incubated in a pH 4.0 for 30 min at 37°C. Each column and vertical bar represent the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, significant difference compared with the viability at pH 4.0.

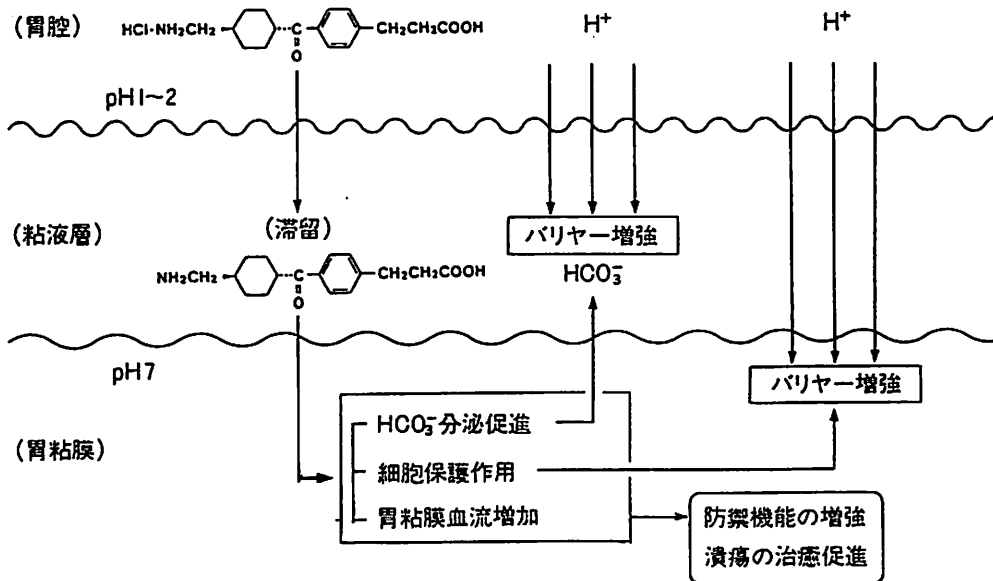


Figure 4 抗潰瘍作用機序

中での ethanol による細胞障害は抑制されなかった。rotraxate の細胞障害抑制作用は indomethacin (0.01 mM) により阻害されなかった。

これらの結果から、rotraxate は重炭酸イオンの分泌促進により粘液層で胃腔内から拡散してくる酸の中和、緩衝を強化するとともに、酸による障害から粘膜細胞を保護すること（細胞保護作用）により粘膜上皮細胞の壊死、脱落の抑制と、上皮細胞下の増殖帯細胞を保護することで、速やかに上皮細胞層を修復し、これらの作用によって胃粘膜バリアーを増強していると考えられる。重炭酸イオン分泌促進、細胞保護作用のいずれも prostaglandin 生合成阻害剤の indomethacin 前処理により影響を受けないことから、rotraxate の胃粘膜バリアー増強作用に胃粘膜の内因性 prostaglandin の関与は少ないと思われる。

以上の結果から、rotraxate の抗潰瘍作用の機序を模式図化すると Figure 4 のようになる。すなわち、経口投与した rotraxate は、消化管から吸収され血流を介して胃粘膜に分布するのでなく、胃腔内から粘液層に滞留し、粘液層から胃粘膜に移行・分布し、薬理作用を発揮する。胃粘膜組織では胃粘膜の血流を増加させると共に、重炭酸イオン分泌促進作用により胃腔内から逆拡散してくる酸を粘液層で中和する機構を増強し、また、細胞保護作用により粘膜細胞の酸に対する抵抗性を上げることにより胃粘膜バリアーを増強する。これらの作用により、潰瘍部位での組織修復を促進すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文の審査については、各審査員が提出された論文の内容について個別に慎重な審査を行い、かつ申請者と面接した結果並びに口頭発表（平成元年 8 月 8 日開催）の内容を踏まえて、平成元年 8 月 23 日開催の論文審査委員会において協議を行い、以下の通り判定した。

周知のごとく消化性潰瘍は、消化管壁に対する攻撃因子と防御因子の均衡の破綻が原因となって発症する。本論文では、まず数種の病態モデルに対する効果を指標にして、塩酸ロトラキサートが防御因子増強型の消化性潰瘍抑制薬であることを推定し、作用機序の解明を試みた。その結果、胃内に適用された塩酸ロトラキサートが、血流を介することなく、直接に胃粘膜に分布して作用すること、並びに複数の防御因子増強作用（胃粘膜血流増大、胃粘膜重炭酸イオン分泌亢進、酸の逆拡散抑制、胃粘膜電位差低下抑制、胃粘膜高分子糖蛋白含量低下抑制、胃粘膜細胞の障害抵抗性増大）の協力作用によって、消化性潰瘍抑制作用を発現することを明らかにした。

消化性潰瘍抑制薬の研究は広範に行われているが、未解決な問題が数多く残されている。本論文中にも触れられているように、新しい作用機序の発見とその解明が、新たな研究の展開の契機となることが多い。本論文で明らかにされた塩酸ロトラキサートの胃壁内への直接分布や胃粘膜細胞抵抗性亢進作用も、消化性潰瘍の病因並びに抑制薬の研究・開発の進歩に貢献する可能性が十分に考えられることから、本論文は博士論文に値するものと認定される。